

Y-STR 基因座在鉴别 I 期临床试验混淆生物样本中的应用初探

曾丽艳 王倩 柯晶 董华娟 孟现民[△]

(上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心 上海 201500)

【摘要】 目的 为了避免 I 期临床试验项目中因混淆生物样本而导致的生物样本数据缺失,使用 Y 染色体短串联重复序列(Y-chromosomal short tandem repeat, Y-STR)基因座检测方法鉴别已混淆的来自 2 个不同性别个体的生物样本,探讨其可行性。**方法** 将缺失标签的两支血液样本重新编号为 A 和 B,分别从其血浆和血细胞样本中抽提 DNA,同时从已知男性(P)和已知女性(N)血细胞样本中抽提 DNA,分别作为阳性和阴性对照。随后利用 PCR 技术体外扩增 3 个 Y-STR 基因座片段(DYS460、DYS513 和 DYS570),最后利用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物。**结果** 电泳条带显示,从 P、N、A 和 B 的血细胞样本中成功抽提到 DNA。与对照相比,A 的血细胞样本均扩增出大小正确的 3 个 Y-STR 基因座 DNA 片段,而 B 的血细胞样本均不能扩增出 DNA 片段。Y-STR 基因座检测方法成功鉴定出男性受试者的样本为 A,女性受试者的样本为 B。**结论** Y-STR 基因座检测方法可以鉴别已混淆的 2 个不同性别个体的生物样本。

【关键词】 I 期临床试验; 生物样本; Y-STR 基因座

【中图分类号】 R446.1, R95 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2021.03.007

Application of Y-STR locus in identifying confused biological samples in phase I clinical trial

ZENG Li-yan, WANG Qian, KE Jing, DONG Hua-juan, MENG Xian-min[△]

(Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201500, China)

【Abstract】 Objective To avoid the lack of biological samples data caused by confounding biological samples in the Phase I clinical trial project, we used Y-chromosomal short tandem repeat (Y-STR) locus detection method to identify confounded biological samples from two individuals of different genders and discuss its feasibility. **Methods** We renumbered two blood samples with missing labels as A and B, extracted DNA from their plasma and blood cell samples, respectively. Meanwhile, we extracted DNA from a known male blood cell sample (P) and a known female blood cell sample (N) as positive and negative controls, respectively. Subsequently, we amplified three Y-STR loci fragments (DYS460, DYS513, and DYS570) *in vitro* using PCR technology. Finally, the amplification products were identified by 2% agarose gel electrophoresis. **Results** The electrophoresis bands showed that DNA was successfully extracted from the blood cell samples of P, N, A and B. Compared with the controls, three Y-STR loci DNA fragments of the correct size could be amplified from the blood cell sample of A, but none of them could be amplified from the blood cell sample of B. The Y-STR locus detection method successfully identified a sample of male subject as A and a sample of female subject as B. **Conclusion** The Y-STR locus detection method can identify confounded biological samples from two individuals of different genders.

“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09304027);上海医学创新研究专项(20MC1920100)

[△]Corresponding author E-mail: scmzm@126.com

网络首发时间:2021-05-12 11:15:01 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.R.20210510.2048.008.html>

【Key words】 phase I clinical trial; biological samples; Y-STR locus

* This work was supported by the “Key New Drug Creation” Science and Technology Major Project (2017ZX09304027) and Shanghai Medical Innovation Research Project (20MC1920100).

I 期临床试验是药物有效性和安全性评价的重要环节,采集自受试者的生物样本是后续检测分析的基础,因生物样本是有限而宝贵的样本资源,所以对生物样本进行有效管理是临床试验质量控制的重要环节^[1-2]。然而在生物样本采集的过程中,难免出现标识信息不清楚或者标签脱落的情况,时常因无法识别生物样本的个体来源而将其销毁处理,这不仅造成了资源的浪费,而且试验数据的缺失在一定程度上导致了临床试验结果的偏倚^[3-5]。我院开展的一项 I 期临床试验中,研究护师在采集 10 号和 22 号受试者血液样本时(10 号受试者为女性,22 号受试者为男性),因采血管负压出现问题而紧急更换了两支空白标签的备用采血管,导致血液样本送到实验室后,实验室工作人员无法判定这两个样本来自哪个个体。研究报道 Y 染色体短串联重复序列(Y-chromosomal short tandem repeat, Y-STR)是位于男性 Y 染色体上的人类多态性短串联重复序列(short tandem repeats, STR)位点,一般情况下,只有男性个体才有 Y 染色体,因此,Y-STR 具有男性遗传、男性特异性的特点,Y-STR 可作为性别鉴定的依据,在标准常染色体 DNA 谱分析不能提供信息的情况下常被法医用于 DNA 分析^[6],如在调查性侵案件的司法取证和父系谱系分化中非常有用^[7]。但是,至今国内外未有将 Y-STR 检测运用于 I 期临床试验的研究报导。为了保证临床试验数据的完整性,本文首次创新性地将 Y-STR 检测方法运用于 I 期临床试验中,以探讨该方法在 I 期临床试验生物样本来源识别中的应用。

资料和方法

样本来源 某生物等效性实验空腹试验部分第一周期第 13 个采血点因标签标识不清而无法辨别的 10 号和 22 号受试者全血样本(6 mL EDTA 抗凝采血管)2 管,实验时分别编号为:A 和 B。已知男性全血样本 1 管,作为阳性对照,编号为 P。已知女性全血样本 1 管,作为阴性对照,编号为 N。

仪器与试剂 血基因组 DNA 小量试剂盒和

D15000 Marker(美国 Axygen 公司),Trans2K Plus DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司),琼脂糖和 6× 加样缓冲液(美国 Genview 公司),2× PCR buffer Mix、Ex Taq HS 和 ddH₂O(日本 TaKaRa 公司),电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),低温离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司),紫外凝胶成像仪(北京天根生化科技有限公司)。引物合成由美国 Invitrogen 公司完成。

DNA 提取 将 P、N、A 和 B 4 支采血管放于低温离心机中,4℃、1 200×g 离心 10 min,分别分离血浆和血细胞沉淀,留作备用,离心操作在采血后 2 h 内完成。按照血基因组 DNA 小量试剂盒说明书分别提取 200 μL 血浆和 200 μL 血细胞沉淀中的 DNA。

基因座选择和引物设计 根据 Y-STR 基因座 DYS460^[8]的序列特征,设定所选目标基因座的片段大小,用 Primer 5.0 软件分别设计正反引物序列(表 1)。DYS513^[9]和 DYS570^[10]的引物序列来源于参考文献(表 1)。

表 1 DYS460、DYS513 和 DYS570 的正反引物序列和产物片段大小

Tab 1 The sequence of the forward and reverse primers and product fragment sizes of DYS460, DYS513 and DYS570

Locus	Primer sequence	Product size (bp)
DYS460	F:5'-ATCCTCTGCCTATCATTT-3' R:5'-GACAGTAGCAAGCACAAAG-3'	124
DYS513	F:5'-ATTGATCCATCCGTCTGTCC-3' R:5'-GTTGGATGAAGGGAGAGCAG-3'	149-169 ^[9]
DYS570	F:5'-TGTCTACAATGGCTCACG-3' R:5'-CATAGTCAAGAAACCAGACA-3'	242-279 ^[10]

PCR 扩增基因片段 将引物稀释成浓度 10 mol/L,每对正反引物各取 10 μL 混合,形成 PCR 引物混合液。DNA 模板分别吸取 A 和 B 的血浆和血细胞样本中提取的 DNA。制备 25 μL 的 PCR 反应液为:12.5 μL 2×PCR buffer Mix、2 μL Ex Taq HS、6 μL ddH₂O、2 μL PCR 引物混合液和 2.5 μL DNA 模板,将 PCR 反应液放于 PCR 扩增仪中扩增(反应条件见表 2)。

表2 体外扩增Y-STR基因座片段(DYS460、DYS513和DYS570)的反应条件

Tab 2 The reaction conditions of Y-STR locus (DYS460, DYS513 and DYS570) amplified in vitro

Step	Reaction temperature	Reaction time	Cycles
1	95 ℃	5 min	1
2	94 ℃	30 s	Step 2 to 4: 20 cycles
3	65 ℃-55 ℃ (-0.5 ℃/cycle)	1 min	
4	72 ℃	1 min	
5	94 ℃	30 s	Step 5 to 7: 15 cycles
6	55 ℃	1 min	
7	72 ℃	1 min	
8	60 ℃	60 min	1
9	4 ℃	∞	1

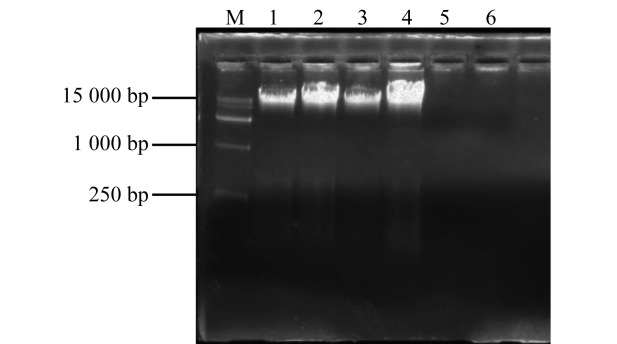
DNA检测 各取5 μL DNA模板,加入1 μL 6×加样缓冲液混匀。制备1%琼脂糖凝胶,将混合液加入凝胶孔中,D15000 Marker作为参照,于120 V电压下电泳15 min。电泳结束后,于紫外凝胶成像仪中拍照观察。

PCR产物检测 各取5 μL PCR产物模板,加入1 μL 6×加样缓冲液混匀。制备2%琼脂糖凝胶,将混合液加入凝胶孔中,Trans2K Plus DNA Marker作为参照,于120 V电压下电泳20 min。电泳结束后,于紫外凝胶成像仪中拍照观察。

结 果

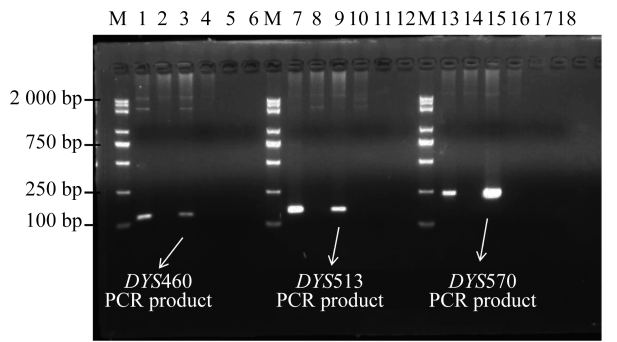
P、N、A和B的血细胞中均抽提到DNA P和N样本的血细胞DNA、A和B样本的血浆和血细胞DNA分别用1%琼脂糖凝胶电泳分离,结果如图1所示。A和B血浆DNA样本均无主条带,而P、N、A和B血细胞样本有清晰的DNA主条带,表明A和B的血浆中DNA含量可能非常少而无法用琼脂糖凝胶电泳分离出,而P、N、A和B的血细胞中均成功抽提到了DNA。

A样本的血细胞DNA均扩增出3个Y-STR基因座 P和N样本的血细胞DNA、A和B样本的血浆和血细胞DNA均分别用3个Y-STR基因座(DYS460、DYS513和DYS570)的引物进行扩增,产物用2%琼脂糖凝胶电泳分离。结果如图2所示,作为阴性对照的N样本血细胞DNA以及B样本的血细胞DNA和血浆DNA都无法扩增出Y-STR基因座条带,而作为阳性对照的P样本血细胞DNA以及A的血细胞DNA样本中均扩增出3个Y-STR基因座,且产物条带大小与理论值(表1)相符,



Lane M: D15000 DNA Marker; Lane 1: DNA extracted from blood cell samples of P; Lane 2: DNA extracted from blood cell samples of N; Lanes 3 and 4: DNA extracted from blood cell samples of A and B; Lanes 5 and 6: DNA extracted from plasma samples of A and B.

图1 血细胞和血浆的DNA电泳结果
Fig 1 DNA electrophoresis results of blood cells and plasma



Lane M: Trans2K plus DNA marker; Lanes 1, 7, 13: The amplification results by using the blood cell DNA of sample P as the template and DYS470, DYS513 and DYS570 as primers, respectively; Lanes 2, 8, 14: The amplification results by using the blood cell DNA of sample N as the template and DYS470, DYS513 and DYS570 as primers, respectively; Lanes 3, 9, and 15: The amplification results by using the blood cell DNA of sample A as the template and DYS470, DYS513 and DYS570 as primers, respectively; Lanes 4, 10, and 16: The amplification results of using the blood cell DNA of sample B as the template and DYS470, DYS513 and DYS570 as primers, respectively; Lanes 5, 11, and 17: The amplification results of using the plasma DNA of sample A as the template and DYS470, DYS513 and DYS570 as primers, respectively; Lanes 6, 12, 18: The amplification results of using the plasma DNA of sample B as a template and DYS470, DYS513 and DYS570 as primers, respectively.

图2 体外扩增DYS460、DYS513和DYS570基因座的电泳结果
Fig 2 Electrophoresis results of in vitro amplification of DYS460, DYS513 and DYS570 loci

说明A样本为20号男性受试者的样本,B样本为10号女性受试者的样本。因A样本的血浆几乎不含Y染色体DNA,因此也无法扩增出产物。

讨 论

I期临床试验常涉及密集采血,血液采集数量多、时间短、要求高,涉及环节也比较多,加上操作人员的熟练程度、受试者的静脉条件、采血管压力等原因,会出现临床样本标识不清、标签脱落等情况,导致无法辨别样本来自哪个个体。

自2015年7月原国家食品药品监督管理总局发布《关于开展药物临床试验数据自查核查工作的公告(2015年第117号)》以后,药物临床试验数据完整性问题越来越受到重视,临床试验质量的控制措施进一步被细化^[11-12]。因此,建立鉴定混淆生物样本的应急管理措施,能够为后续生物样本的检测和数据的完整性提供样本基础,从而保障临床试验的质量。

本文以血细胞DNA为模板,选取Y染色体的3个基因座(DYS460、DYS513和DYS570),成功鉴别出2个不同性别受试者的血液样本。针对不同性别受试者的血液样本混淆的情况,此方法可以作为生物样本质量控制中的一种应急措施,建议将其纳入生物样本质量控制的标准操作规程中。然而,本文探讨的案例限于两位异性受试者样本的鉴别,至于多位男性受试者的样本的鉴别方法,因Y-STR的基因多样性和单倍型多样性^[13-14],以及Y-STR基因座存在突变的可能^[15-16],建议可以利用个人前后采血点的样本进行Y-STR的检测和比对分析,但是其中涉及的相关伦理问题还需要进一步研究决定。为了尽可能避免样本标识数据缺失的情况,除了在样本采集前对物品进行充分准备外,也应对研究护士加强培训,如可以配备一名机动护士在旁边,帮助采血护士及时补上样本标识信息。此外,本文提倡的应急措施还需进一步建立统一的操作标准,有待在后续研究中进行完善。

作者贡献声明 曾丽艳 论文构思,实验执行,数据采集,统计分析,论文撰写和修订。王倩 数据分析、论文撰写和修订。柯晶 文献调研和整理。董华娟 论文修订。孟现民 研究指导,论文修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

[1] 寇莹莹,赵敏,李苗.临床试验生物样本全流程管理模式

构建[J].中国食品药品监管,2019(12):58-60.

[2] 杜萍,李鹏飞,刘丽宏.I期药物临床试验质量管理的特点[J].中国临床药理学杂志,2017,33(13):1244-1247.

[3] LIAO JM, STACK CB. Annals understanding clinical research: implications of missing data due to dropout[J]. *Ann Intern Med*, 2017, 166(8):596-598.

[4] MAVRIDIS D, WHITE IR. Dealing with missing outcome data in meta-analysis[J]. *Res Synth Methods*, 2020, 11(1):2-13.

[5] FERNANDEZ-FERRO J, SCHWAMM LH, DESCALZO MA, et al. Missing outcome data management in acute stroke trials testing iv thrombolytics. Is there risk of bias? [J]. *Eur Stroke J*, 2020, 5(2):148-154.

[6] KAYSER M. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview[J]. *Hum Genet*, 2017, 136(5):621-635.

[7] DU W, FENG P, HUANG H, et al. Technical note: developmental validation of a novel 6-dye typing system with 36 Y-STR loci[J]. *Int J Legal Med*, 2019, 133(4):1015-1027.

[8] GETTINGS KB, BORSUK LA, BALLARD D, et al. STRSeq: A catalog of sequence diversity at human identification Short Tandem Repeat loci [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, 31:111-117.

[9] DAI HL, WANG XD, LI YB, et al. Characterization and haplotype analysis of 10 novel Y-STR loci in Chinese Han population[J]. *Forensic Sci Int*, 2004, 145(1):47-55.

[10] HANSON EK, BERDOS PN, BALLANTYNE J. Testing and evaluation of 43 "noncore" Y chromosome markers for forensic casework applications[J]. *J Forensic Sci*, 2006, 51(6):1298-1314.

[11] 何高丽,曾涛,张炜,等.药物临床试验数据核查临床部分常见问题的原因分析及控制措施[J].中国新药与临床杂志,2018,37(1):24-28.

[12] 彭真,王崇薇,陈尹,等.某机构药物临床试验数据核查发现问题及改进措施[J].中国医院药学杂志,2018,38(21):2267-2272.

[13] JIANG W, GONG Z, RONG H, et al. Population genetics of 26 Y-STR loci for the Han ethnic in Hunan Province, China[J]. *Int J Legal Med*, 2017, 131(1):115-117.

[14] SONG F, XIE M, XIE B, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of 29 Y-STR loci in the Tibetan population from Sichuan Province, Southwest China[J]. *Int J Legal Med*, 2020, 134(2):513-516.

[15] CLAERHOUT S, VANDENBOSCH M, NIVELLE K, et al. Determining Y-STR mutation rates in deep-rooting genealogies: Identification of haplogroup differences [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2018, 34:1-10.

[16] HUSZAR TI, JOBLING MA, WETTON JH. A phylogenetic framework facilitates Y-STR variant discovery and classification via massively parallel sequencing[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2018, 35:97-106.

(收稿日期:2020-07-28; 编辑:王蔚)